

АНОТАЦІЯ

Бондаренко П. С. Експериментальне дослідження фармакодинаміки та фармакокінетики кристалічних форм похідних 4-*R*-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 – «Медицина». - Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, 2021.

Дослідження присвячене вирішенню актуального завдання фармакології - пошуку перспективних речовин з анальгетичною та протизапальною активністю серед похідних 4-*R*-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот на підставі експериментальних досліджень фармакодинаміки та фармакокінетики різних кристалічних модифікацій найбільш активних сполук.

Доповнено наукові дані щодо можливості розробки нових потенційних анальгетичних та протизапальних засобів серед похідних 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти. Доведено можливість отримання її ефірів алкілуванням відповідної натрієвої солі. В процесі хімічного синтезу було виявлено, що гетерогенна кристалізація з етанолу призводить до утворення моноклінної поліморфної форми етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (сполука NI-75), тоді як гомогенна кристалізація -ромбічної форми (сполука NI-77). Отримані кристали ромбічної форми виявили помірну знеболюючу дію (66,0 %), і дуже слабку протизапальну дію (30,7 %), тоді як моноклінна форма – потужні анальгетичну та антиексудативну активності (90,6 та 85,8 %, відповідно), що перевищувало дію інших представників класу оксикамів ($p < 0,05$). Серед синтезованих за участі різних розчинників *N*-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів отримано енантіоморфні (дзеркальні) різновиди, які відрізнялись силою анальгетичної та

протизапальною дією. Сполука NI-34 мала більш потужні анальгетичні і відносно слабкі протизапальні властивості, які становили 64,7 та 22,1 % відповідно. Її дзеркальний поліморф (сполука NI-35) виявилась слабким анальгетиком (ця активність становила 26,3 %), з більш виразними протизапальними властивостями (антиексудативна активність становила 62,2 %).

В процесі хімічного синтезу N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду було виявлено, що кристалізація із етилацетату, мета-ксилолу або орто-ксилолу забезпечує утворення трьох видів кристалів з різним габітусом — довгих паличок квадратного перерізу (форма А, сполука NI-50), тонких долотоподібних пластин (форма В, сполука NI-51) або подовжених блоків (форма С, сполука NI-52) в яких зберігалась ідентичність всіх параметрів внутрішньої структури. Скринінгові дослідження на моделі карагенінового набряку у щурів показали, що всі зразки в дозі 20 мг/кг внутрішньочеревно зменшують гіперальгезію та набряк ураженої кінцівки, однак ступінь протизапального та знеболюючого ефектів був різний. Найбільшу активність показала сполука В, показники антифлогогенної та анальгетичної активності якої становили 85,2 та 93,5 %, що було вищим за всі інші сполуки та за препарати порівняння ($p < 0,05$). Сполука С поступалась силі цих ефектів, і найменш активною виявилась сполука А, однак всі сполуки перевершували за своїми ефектами препарати порівняння.

Таким чином, лише кристалічні форми N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду одночасно виявляли виразні протизапальну та знеболюючу активності, тому для подальших поглиблених досліджень були обрані саме ці сполуки (А, В, та С).

Більш детально анальгетичні властивості сполук А, В та С в були проведені на п'яти моделях больової перцепції («оцтово-кислі корчі» у мишей, «гаряча пластинка», «tail-flick», електричне подразнення кореня хвоста та діабетична полінейропатія у щурів). Встановлено, що за

внутрішньоочеревинного введення, серед трьох кристалічних форм, сполука В найбільш ефективно усувала соматичний вісцеральний біль (аналгетична активність (АА) становить 87,5 %), сполука С незначно поступалась їй (АА дорівнює 76,9%), той час як сполука А виявляла найменшу активність (АА становить 35,1 %). При зміні способу введення на пероральний, тенденція залишається: $V \gg C > A$. При вивченні впливу кристалічних форм А, В і С на центральний компонент ноцицептивної реакції («гаряча пластина» та «tail-flick»), сполука В перевершувала інші за обох способів введення, але сполука А була більш ефективною за сполуку С. За цих умов при зміні внутрішньоочеревного введення на пероральний прийом всі три зразки втрачали приблизно 30% своєї анальгетичної активності. Дослідження на моделі електричного подразнення кореня хвоста щурів дозволили простежити тривалість розвитку анальгетичного ефекту кристалічних форм А, В та С. Було виявлено, що сполука В має потужний і швидкий знеболюючий ефект, який після 2-ї години експерименту починає помітно зменшуватися. Активність сполуки С була менш виражена, хоча також досягала свого максимуму на 2-й години з подальшим поступовим зменшенням. Сполука А, на відміну від інших двох кристалічних поліморфів, на першій годині досліду мала дуже низьку активність, яка потім поступово посилювалась і сягала свого піку лише на 4-й годині, і цей ефект зберігався більш тривало в порівняно з іншими тест-зразками. Результати, отримані на моделі нейропатичного больового синдрому, викликаного стрептозотоцин-індукованим діабетом у щурів, підтвердило лідерство за знеболюючою активністю саме кристалічної форми у вигляді паличок (сполука В).

Вперше проведена порівняльна оцінка ефективності та безпечності трьох кристалічних модифікацій N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду. За показником гострої токсичності (LD₅₀) кристалічні форми А, В і С за їх перорального введення розташувались: $C < B < A$, а за показником ульцерогенності (UD₅₀) - $B \ll C < A$. Розрахунок коефіцієнта безпечності (LD₅₀/UD₅₀) показав, що найкращий

результат виявився у сполуки В (7,99), дещо нижчий – у сполуки А (5,88), а найнижчий – у сполуки С (4,97). За ефективністю аналгетичної дії (показником ED₅₀) найкращі результати показала сполука В, оскільки її середня ефективна доза на моделі термічного подразнення «tail flick» становила 2,15±0,11 мг/кг, тоді як для сполук С і А – 2,42±0,12 та 3,19±0,16 мг/кг, відповідно. Тобто, найбільш перспективною речовиною слід вважати кристалічну модифікацію похідного бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді пластин (сполука В).

Розширено наукові уявлення щодо особливостей фармакокінетики різних кристалічних форм біологічно активних сполук. Так, вперше визначений фармакокінетичний профіль поліморфних форм похідного бензотіазин-3-карбоксаміду за їх перорального введення *in vivo*. Методом високоефективної рідинної хроматографії в крові мишей визначено концентрацію сполук та розраховано основні параметри фармакокінетики. Виявлено, що у сполуки В константа абсорбції статистично переважає аналогічний у сполуки А на 12,1 %, а сполуки С – на 20,2 %, також у неї реєструється більш високий показник максимальної концентрації, який на 20,6 % переважає сполуку А ($p < 0,05$) та недостовірно ($p > 0,05$) - сполуку С, а час її досягнення у сполуки В був вдвічі швидшим, ніж у форми А. Поряд з цим, у сполуки В відмічається найбільша біодоступність (для сполуки В цей параметр був достовірно вищим на 12,5 та 2,6 % за такий у поліморфних форм А та С), швидка елімінація (константа елімінації сполуки В була в 1,48 рази більшою порівняно з сполукою А та С), найменший час напівелімінації (на 34,7-31,6 % менший за поліморфні форми А і С, ($p < 0,05$), а також найбільша величина загального кліренсу (на 18-25 %, більше, ніж у інших сполук). Виявлені особливості у фармакокінетиці кристалічних форм можуть пояснити отримані відмінності у фармакодинаміці цих композицій, що в сукупності дозволяє рекомендувати сполуку В для подальших поглиблених досліджень в якості протизапального та аналгетичного засобу.

Отримано нові дані щодо протизапальної активності сполуки В у щурів. Показано, що N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2*λ*⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід у формі паличок (сполука В) здатний зменшувати всі компоненти запальної реакції – альтерацію, ексудацію та проліферацію. Так, антиексудативна активність сполуки В на моделі токсичного набряку легень, викликаного амонію хлоридом, становила 64,0 %, і була вірогідно більшою за дію мелоксикама ($p < 0,05$), антипроліферативна властивість сполуки В на моделі «ватної» гранульоми у щурів була помірно виражена (15,1 %), що однак не сягало статистично вірогідної різниці порівняно з референс-препаратом. Дослідження впливу сполуки В та мелоксикаму на альтеративний компонент запальної реакції (на моделі площинних ран шкіри), продемонструвало, що сполука В за здатністю зменшувати розміри ранового дефекту переважала мелоксикам на 5-ту та 21-шу добу експеримента ($p < 0,05$). Кількість тварин, у яких на 28-добу після нанесення рани спостерігалось повне рубцювання площинної рани, в групі контролю становило 42,8%, тоді як на тлі введення сполуки В та мелоксикаму їх кількість становила 85,7 та 71,4% відповідно ($p < 0,05$).

Дослідження антипіретичної дії на моделі молочної лихоманки у щурів показало, що сполука В та мелоксикам вірогідно знижували температуру тіла тварин, однак за вираженістю цього ефекта на 5-й годині після введення пірогену сполука В поступалась мелоксикаму, на 6-й годині – практично співставлялась, і на 7-й годині після моделювання пірогенної реакції – перевершувала препарат порівняння ($p < 0,05$).

На моделі хронічного автоімунного запального процесу (ад'ювантного артриту) показано, що лікувальне введення сполуки В зменшувало клінічні прояви запальної реакції, протидіяло змінам гематологічних показників (зростання ШОЕ та кількості лейкоцитів у порівнянні з нелікованими тваринами становило 13,3 та 3,92 %, відповідно проти 185 та 216 % у нелікованих тварин), що було співставним з дією мелоксикаму. Дослідження біохімічних маркерів запального процесу у внутрішніх органах щурів з

ад'ювантним артритом на прикладі слизової оболонки шлунка показало, що застосування сполуки В вірогідно зменшувало викликані запальним процесом елевацію рівня IL-1 β та активності P_gH-синтази (в 1,27 та 1,51 рази), порівняно з нелікованими тваринами, $p < 0,05$). Крім того, введення тваринам сполуки В зменшувало гіперпродукцію прозапальних медіаторів – нітроген монооксиду (вміст нітратів та нітритів та сумарна активність NO-синтази зменшувались в 1,21 та 1,34 рази відповідно), та гідроген сульфід (рівень H₂S і активність ЦГЛ – зменшувались в 1,18 та 1,31 рази, відповідно ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин), що було статистично більш значущим, ніж за умов введення мелоксикаму ($p < 0,05$). Отже, протизапальна дія похідного карбоксаміду статистично переважала препарат порівняння.

Таким чином, нове оригінальне похідне N-(трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді кристалічної форми – палички (сполука В) виявляє виразну анальгетичну, протизапальну, помірну антипроліферативну, антиальтеративну та антипіретичну дію, а низька гастротоксичність її дає підстави рекомендувати цю сполуку для подальших доклінічних досліджень як потенційного нестероїдного протизапального засобу.

Ключові слова: похідні 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот, кристалічна будова, поліморфні модифікації, анальгетична, протизапальна дія, ульцерогенність, гостра токсичність, фармакокінетика, гідроген сульфід, NO-синтаза, P_gH-синтаза, IL- β , щури.

Список публікацій здобувача.

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.

1. Bondarenko, P. S. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial

anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51. DOI: <https://doi.org/10.31393/bba41-2020-08> (Дисертанту належить огляд літератури, виконання експерименту, статистичну обробку отриманих даних, формування висновків та узагальнення; підготовка, оформлення статті виконано у співавторстві).

2. Бондаренко, П. С. Дослідження протизапальної та жарознижувальної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у щурів / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. - 2021. - №1 (25). - С. 27-32. DOI: [10.31393/reports-vnmedical-2021-25\(1\)-05](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2021-25(1)-05). (Здобувач особисто виконав дослідження фармакологічної активності сполуки, що вивчалась, провів статистичну обробку результатів, у співавторстві аналізував отримані результати та формулював висновки).

3. Бондаренко, П. С. Дослідження впливу N-(трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на біохімічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту / П. С. Бондаренко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15 №3, С. 81-88 <https://doi.org/10.33250/15.03.181>

4. Bondarenko, P. S. Synthesis, Crystal Structure, and Biological Activity of Ethyl 4-Methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylate Polymorphic Forms / I. V. Ukrainets, A. A. Burian, V. N. Baumer, S. V. Shishkina, L. V. Sidorenko, I. A. Tugaibei, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko // Sci Pharm. – 2018. – Vol. 86(2). - 21. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm86020021>. (Last accessed: 02.05.2021). (Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертантом особисто виконано експерименти з визначення протизапальної і знеболюючої дії хімічних сполук; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

5. Bondarenko, P. S. Biological properties of two enantiomorphic forms of N-(2, 6-dimethylphenyl)-4-hydroxy-2, 2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, a structural analogue of piroxicam / S. V. Shishkina, I. V. Ukrainets,

O. V. Vashchenko, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko, L. A. Petrushova, G. Sim. // Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry.- 2020. – Vol.76 (Pt 1) – P. 69-74. doi: 10.1107/S2053229619016450. (Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертант особисто провів експериментальні дослідження біологічної активності поліморфних сполук; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

6. Bondarenko, P. S. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, Voloshchuk, P. S. Bondarenko, S. V. Shishkina, L. V. Sidorenko, G. Sim.// Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001> (Last accessed: 02.05.2021). (Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертант здійснював експериментальні дослідження біологічної активності хімічних сполук; у співавторстві формулював висновки та оформлював статтю).

7. Пат. № 118642 Україна UA C2 МПК C07D 279/02 (2006.01) A61K 31/5415 (2006.01) A61P 29/02 (2006.01) Моноклінна кристалічна модифікація етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин3-карбоксилату, яка виявляє протизапальну та анальгетичну активність / Українець І. В., Бур'ян Г. О., Шишкіна С. В., Волощук Н. І., Бондаренко П. С.; заявник і патентовласник Українець Ігор Васильович, вул. Кричевського, 40, кв. 11, м. Харків, 61027 (UA); заявл. 20.06.2018; опубл. 11.02.2019, Бюл.№ 3. (Дисертант особисто провів експериментальні дослідження біологічної активності поліморфних сполук; написання та оформлення патенту виконано у співавторстві)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

8. Анальгетична активність різних кристалічних форм N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко, І. В. Українець, Л. О. Петрушова // Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. – С. 22. (Дисертант

брала участь в експериментальних дослідженнях, аналізі та узагальненні отриманих даних, написання тез виконано у співавторстві).

9. Поліморфні модифікації етил-4-метил-2,2-діксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату та їх властивості / Г. О. Бур'ян, І. В. Українець, Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (12-13 квітня 2018 р., м. Харків). - Харків, 2018. - С. 22-23. *(Здобувач проводив аналіз даних літератури, дослідження біологічної активності сполук, статистичну обробку отриманих результатів, оформлення та подачу тез до друку).*

10. Бондаренко, П. С. Дослідження гострої токсичності та ульцерогенної дії різних кристалічних модифікацій N-г-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / П. С. Бондаренко // Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2018» 18-20 квітня 2018 р., м. Вінниця, с. 438.

11. Crystalline forms of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, their toxicity and ulcerogenic effect / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko // 8th International Conference “Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles” in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (12-16 November, 2018 Kharkiv, Ukraine). - CNCH-2018. Book of Abstracts. - Kharkiv, 2018. - P. 146. *(Дисертант особисто виконав фармакологічні дослідження, їх статистичну обробку; написання тез виконано у співавторстві).*

12. Бондаренко, П. С. Дослідження анальгетичної та протизапальної активності N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в експерименті / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук, О. М. Денисюк // Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології

«Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.). – Вінниця, 2019. - С 37-39. *(Здобувачу належить виконання фармакологічних досліджень, статистичну обробку результатів; написання тез виконано у співавторстві).*

13. Бондаренко, П. С. Експериментальне дослідження антиексудативної дії N-(4-трифлюорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / П. С. Бондаренко // Матеріали XVIII Наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2021» (15-17 квітня 2021 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2021. - С. 492.